

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05686

研究課題名(和文) 感染による炎症性骨破壊を制御する神経骨免疫ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Study of osteo-nociceptive-immune system

研究代表者

丸山 健太 (Maruyama, Kenta)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：60724119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、痛覚神経を遺伝学的に除去した無痛マウスを用いて感染随伴疼痛を感知した際に誘発される自然免疫系や骨代謝系の変調を分子レベルで解明することを目的として研究を行ってきた。その結果、Nav1.8イオンチャネル陽性痛覚神経に発現するTRPV1/TRPA1チャネルの侵害受容による活性化が骨髄炎に影響を及ぼし、そこに、末梢神経から軸索反射によって放出されるCGRPと転写因子Jdp2が関与するという興味深い事実を見出し、「骨-自然免疫-痛覚」連関ともいうべき新しい免疫生理システムの提唱に至った。

研究成果の概要(英文)：It is established that nociceptor innervation occurs in skin and bone, but the mechanisms of nociceptive modulation in fungal inflammation remain unclear. In this study, we show that *C. albicans* stimulates Nav1.8-positive nociceptors via the β -glucan receptor Dectin-1 to induce CGRP. This induction of CGRP is independent of Bcl-10 or Malt-1 but dependent on TRPV1/TRPA1 ion channels. Hind paw β -glucan injection after Nav1.8-positive nociceptor ablation or in TRPV1/TRPA1 deficiency showed dramatically increased osteo-inflammation accompanied by impaired CGRP production. Strikingly, CGRP suppressed β -glucan-induced inflammation and osteoclast multinucleation via direct suppression of NF- κ B p65 by the transcriptional repressor Jdp2 and inhibition of actin polymerization, respectively. These findings clearly suggest the role of Dectin-1-mediated sensocrine pathways in the resolution of fungal osteo-inflammation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨代謝 真菌感染 痛覚

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤・ステロイド使用中や糖尿病などで免疫不全状態にある患者はカンジダ等の常在性真菌による感染に脆弱であり、高齢化による日和見感染の増加に伴い疼痛を伴った皮膚・生殖器・副鼻腔・骨関節の真菌感染症に遭遇するケースは増加している。真菌は上皮組織や骨の破壊を引き起こすほか、その全身感染は時として致死的な敗血症を惹起する。また、侵害受容神経が欠損する先天性無痛症患者では四肢の外傷や真菌性の関節炎、さらには骨髄炎が多発することが知られる。侵害受容神経は皮膚粘膜や関節といった真菌の好む感染領域に豊富に分布しているが、なぜ先天性無痛症患者の局所感染が容易に骨髄炎を惹起するのかは不明である。疼痛は自由神経終末(髄鞘が欠落した神経末端)が侵害受容器となっている1次求心性の後根神経節ニューロン(Dorsal root ganglion neuron, DRGN)によって感知され、これが侵害受容神経の本体とされる。近年、DRGNが抹消において痛みの受容以外の機能を果たしていることが明らかとなってきた。例えば、DRGNがインスリンの分泌調節を介し寿命を制御しているとする報告(Celine E. Riera et al, Cell 2014)や、DRGNの除去が乾癬の病態を軽快させる(Lorena Riol-Blanco et al, Nature 2014)ことが判明し、侵害受容神経の内分泌系・免疫系に対する作用の存在が浮き彫りとなった。また最近、黄色ブドウ球菌の α ヘモリシンがDRGNを直接刺激して痛みを生じさせていること(Isaac M. Chiu et al, Nature 2013)が発見され、侵害受容神経系が免疫細胞のように細菌を直接認識していることが判明した。DRGNの内分泌系・免疫系以外への作用も報告されており、例えば神経細胞特異的なSema3aKOマウスでは感覚神経の骨への侵入が障害された結果骨形成が低下しており、骨発生における感覚神経の重要性が指摘されている(Fukuda et al, Nature 2013)。これら

の知見は、侵害受容神経系が骨自然免疫系と関連していることを示唆しているが、真菌感染時における侵害受容神経による病態修飾の可能性は全く検討されていない。そこで本研究では遺伝学的方法論で侵害受容神経を選択的に除去したマウスとカンジダ生菌またはカンジダ菌体成分惹起性の局所感染/局所炎症モデルを駆使することで、世界にさきがけて真菌によって刺激された侵害受容神経が骨自然免疫系に与える影響を観察する。また、これまで全く研究のなされていない侵害受容神経による真菌感知機構および真菌刺激によって侵害受容神経より分泌される液性因子の骨自然免疫系修飾作用の分子機序の解明を通して、真菌局所感染制御における痛覚神経の知られざる機能の同定に挑む。

2. 研究の目的

カンジダをはじめとする常在性真菌は疼痛を伴った皮膚・生殖器・関節への局所感染により、組織や骨の破壊を引き起こす。真菌の局所感染は年々増加の一途を辿っており、その全身感染は時として致死的な敗血症を惹起する。近年、先天性無痛症患者では四肢の外傷や真菌性の関節炎、さらには骨髄炎が多発することが明らかとなってきた。侵害受容神経は皮膚や関節といった真菌の好む感染領域に豊富に分布するが、なぜ先天性無痛症患者が易感染性・易骨破壊性といった表現型を呈すのかは明らかでない。本研究では侵害受容神経を除去したマウスとカンジダ惹起性の局所感染モデルを組み合わせることで侵害受容神経が骨自然免疫系に与える影響を評価し、その分子機序の解明を通して「真菌性疼痛の感知機構と真菌感染病態の痛覚神経性制御」の概念をつくりだすことを目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、カンジダの構成因子(β グルカン、マンナン、キチン、キトサン)の中で

疼痛を惹起する主成分を同定し、それが如何なるシグナル伝達経路(Dectin シグナル経路、TLR シグナル経路、インフラマソーム経路)、如何なる侵害受容神経系に発現する真菌受容体(Dectin1, Dectin2, Mincle, TLR2, TLR6)で認識されているのかを各種 KO マウスを駆使して探索する。また、培養 DRGN の Ca イメージングにより、同定されたカンジダ成分が真の発痛分子であるかどうかを評価した上で、真菌認識受容体がどのような分子機序で Ca シグナルを活性化するのかを生化学的・電気生理学的に解明する。これに加え、薬剤および遺伝学的方法論(Nav1.8Cre マウスと Rosa26-DTA マウスを掛け合わせ、遺伝学的に侵害受容神経を除去したマウス)によって DRGN を除去したマウスの足底にカンジダを局所感染させ、炎症や骨破壊の程度を定量する。申請者らの予備的検討では、カンジダによって DRGN より多量に分泌される CGRP はマクロファージの炎症性サイトカイン産生と遊走機能を抑制し、この抑制作用には転写因子 Jdp2 が必須である。そこで、Jdp2KO マウスにカンジダを局所感染させた際の炎症反応の評価を行った上で、CGRP で活性化された Jdp2 の直接の標的遺伝子探索を生化学的にすすめる。また、CGRP が破骨細胞に誘導する下流の情報伝達機構を *in vitro* における生化学的解析を通して明らかにすることで、DRGN が骨破壊を抑制する分子機構を解明する。

4. 研究成果

興味深いことに、Nav1.8 陽性の DRGN には真菌受容体である Dectin-1 が発現しており、Dectin1 シグナルを伝達する Bcl10/Malt1 遺伝子や免疫細胞は真菌性急性疼痛には関与していなかった。fMRI や電気生理学的解析からは、驚くべきことに、DRGN に発現する Dectin1 が新たな真菌性急性疼痛のセンサー/真菌性搔痒の増強センサーとして機能している可能性が示唆され、神経性 Dectin1 が新

たな痛み/痒みの治療標的となりうることを示唆するデータを得ている (Maruyama et al, 投稿中)。Nav1.8 陽性神経を遺伝学的に除去したマウス(無痛マウス)を作成したところ、破骨細胞の融合亢進をともなった重篤な骨粗鬆症が観察され、Nav1.8 陽性痛覚神経が破骨細胞の融合を抑制することが明らかとなった。また、無痛マウスに LPS 誘発性骨髄炎を惹起すると炎症と骨破壊は正常に生じたが、カンジダやカンジダの細胞壁構成成分である β グルカン誘発性骨髄炎はコントロールマウスと比べて増悪していた。これらの結果は、Nav1.8 陽性痛覚神経が細菌感染ではなく、真菌感染の炎症と骨破壊を特異的に抑制する機能を持っていることを示唆している。近年、痛覚神経を除去すると皮膚の Th17 細胞が減少し、真菌感染後の生体内における真菌コロニー数が増加するという報告がなされたが(Riol-Blanco et al, Nature 2014 Kashem et al, Immunity 2015)、我々の作成した無痛マウスではそうした表現系はみられず、既報の再現をとることができなかった。また、炎症性骨破壊の元凶は Th17 であるとする学説が広く信じられているが(Sato et al, JEM 2006)、Th17 を誘導するとされる β グルカン誘導性炎症による骨破壊は T 細胞の depletion によって変化せず、こちらについても既存の学説を支持する結果を得ることができなかった。また、無痛マウスにみられる真菌性骨髄炎の増悪は、TNF の中和抗体によって救済されたことから、Nav1.8 陽性神経は真菌感染の際の TNF 産生を抑制することで、骨破壊と炎症の増悪を阻止していることが判明した。真菌感染の際に血中で強く誘導される DRGN 由来のペプチドを網羅的に測定したところ、CGRP が同定された。CGRP は LPS の皮下投与後 24 時間で一過性の血中濃度上昇を示したが、それ以降は検出されなかった。一方、 β グルカンを皮下投与すると、血中の CGRP 濃度は数日間にわたり非常に高い状態が維

持された。 β グルカン皮下投与後の血中 CGRP 濃度の上昇は、Dectin1 や TRPV1/TRPA1 の KO マウスならびに無痛マウスで消失していた。興味深いことに、免疫細胞における Dectin1 シグナルの伝達に必須である Bcl10 や Malt1 遺伝子の KO マウスでは正常に CGRP の誘導が生じた。これらの結果は、 β グルカンの皮下投与により痛覚神経の Dectin1 が刺激され、痛覚神経に存在する TRPV1/TRPA1 が活性化することで CGRP が産生誘導されることを示唆している。興味深いことに、TRPV1/TRPA1 の KO マウスは β グルカン誘発性の骨髄炎が著名に増悪していた。また、CGRP の投与は無痛マウスや TRPV1/TRPA1 KO マウスの β グルカン誘発性の骨髄炎増悪を寛解させたことから、無痛マウスや TRPV1/TRPA1 KO マウスの真菌性骨髄炎の増悪は CGRP の産生が低下していることに起因しているものと推測された。それでは、CGRP はどのようにして骨破壊や炎症を抑制しているのだろうか？ 詳細な解析の結果、CGRP は cAMP を介して破骨細胞のアクチンの脱重合を促し、細胞融合を阻害することで破骨細胞の活性を抑制していることが明らかとなった。また、CGRP と β グルカンの刺激はマクロファージに転写因子 Jdp2 を誘導し、Jdp2 が NF- κ B の p65 サブユニットと結合してその活性を抑制することで CGRP の抗炎症効果が発揮されることが判明した。その証拠に、Jdp2 の KO マウス由来のマクロファージでは CGRP 刺激による β グルカン誘発性炎症の抑制作用が完全に消失していた。以上より、Nav1.8 陽性痛覚神経は真菌感染の際に Dectin1 を介して多量の CGRP を産生し、CGRP が破骨細胞融合とマクロファージの炎症を cAMP の誘導や転写因子 Jdp2 を介して抑制していることが明らかとなった。現在、多くの科学者は疼痛の炎症惹起仮説を信奉しているが、本成果は痛覚神経や疼痛が進化的に保存されてきた理由を説明するための

「真菌疼痛誘導性骨免疫抑制理論」の科学的根拠を世界にさきがけて示したものである。この仮説は、前述したように、無痛マウスが細菌やその構成成分に対してはほぼ正常な骨炎症応答をするのに対して、真菌やその構成成分に対しては極めて激しい骨炎症応答を示すという観察事実から導かれたものであり、本学説は痛覚神経の生物学的機能に新しい示唆をもたらすものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Hisashi Kanemaru, Fumihito Yamane, Kiyoharu Fukushima, Takanori Matsuki, Takahiro Kawasaki, Isao Ebina, Kanako Kuniyoshi, Hiroki Tanaka, **Kenta Maruyama**, Kazuhiko Maeda, Takashi Satoh, and *Shizuo Akira. "Antitumor effect of Batf2 through IL-12 p40 up-regulation in tumor-associated macrophages" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol 114, No 35, E7331-E7340 2017 [査読有]
2. ***Kenta Maruyama**, Yasunori Takayama, Takeshi Kondo, Ken-ichi Ishibashi, Bikash Ranjan Sahoo, Hisashi Kanemaru, Yutaro Kumagai, Mikael M. Martino, Hiroki Tanaka, Naohito Ohno, Yoichiro Iwakura, Naoki Takemura, Makoto Tominaga, and Shizuo Akira. "Nociceptors Boost the Resolution of Fungal Osteo-inflammation via the TRP channel-CGRP-Jdp2 axis" *Cell Reports*, Vol. 19, pp2730-2742, 2017 [査読有]
3. Michelle Sue Jann Lee, **Kenta Maruyama**, Yukiko Fujita, Aki Konishi, Patrick M. Lelliott, Sawako Itagaki, Toshihiro Horii, Jing-wen Lin, Shahid Kahn, Etsushi Kuroda, Shizuo Akira, Ken J Ishii, and *Cevayir Coban. "Plasmodium products persist in the bone marrow and promote chronic bone

- loss" *Science Immunology*, Vol. 2, eaam8093 2017 This paper was selected as cover picture. [査読有]
4. Bikash R. Sahoo, Kenta Maruyama, Jyotheeswara R. Edula, Takahiro Tougan, Yuxi Lin, Young-Ho Lee, Toshihiro Horii, and *Toshimichi Fujiwara. "Mechanistic and structural basis of bioengineered bovine Cathelicidin-5 with optimized therapeutic activity" *Scientific Reports*, doi:10.1038/srep44781, 2017 [査読有]
 5. *Kenta Maruyama, Naoki Takemura, Mikaël M. Martino, Takeshi Kondo, and Shizuo Akira. "Netrins as Prophylactic Targets of Skeletal diseases: A Double-Edged Sword?" *Pharmacological Research*, Vol. 122, pp46-52, 2017 This paper is an invited review article. [査読有]
 6. *Kenta Maruyama, Takahiko Kawasaki, Masahide Hamaguchi, Motomu Hashimoto, Moritoshi Furu, Hiromu Ito, Takao Fujii, Naoki Takemura, Thangaraj Karuppuchamy, Takeshi Kondo, Takumi Kawasaki, Masahiro Fukasaka, Takuma Misawa, Tatsuya Saitoh, Yutaka Suzuki, Mikaël M. Martino, Yutaro Kumagai, and *Shizuo Akira. "Bone-protective Functions of Netrin 1 Protein" *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 291, pp23854-23868, 2016 This paper was selected as cover picture. [査読有]
 7. Mikaël M. Martino, Kenta Maruyama, Scott Stanger, Takashi Satoh, Osamu Takeuchi, Ralph Muller, and *Shizuo Akira. "Inhibition of IL-1R1/MyD88 signaling promotes mesenchymal stem cell-driven tissue regeneration" *Nature Communications*, 7, 11051, 2016 [査読有]
 8. Yukiko Kuroda, Kenta Maruyama, Hideki Fujii, Isamu Sugawara, Shigeru Ko, Hisataka Yasuda, Hidenori Matsui, and *Koichi Matsuo. "Osteoprotegerin Regulates Pancreatic β -Cell Homeostasis upon Microbial Invasion" *PLOS One*, Vol.11, e0146544, 2016. [査読有]
 9. *Kenta Maruyama and *Shizuo Akira. "Emerging molecules in the interface between skeletal system and innate immunity" *Pharmacological Research*, Vol.99, pp223-228, 2015 This paper is an invited review article. [査読有]
 10. *Kenta Maruyama and *Shizuo Akira. "New molecules in bone biology and their unexpected roles: from an "osteo-innate-immunological" point of view" *Musculoskeletal Regeneration*, Vol.1, No.1, 2015 [査読有]
 11. Mikaël M. Martino, Priscilla S. Briquez, Kenta Maruyama, and *Jeffery A. Hubbell. "Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration" *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.94, pp41-52, 2015 [査読有]
 12. *Kenta Maruyama, Masahiro Fukasaka, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi, Takeshi Kondo, Tatsuya Saitoh, Mikaël M. Martino, and *Shizuo Akira. "5-azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine tuning osteoclast survival" *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, pp9377-9386, 2015 This paper was selected as cover picture. [査読有] *は責任著者
- [学会発表] (計 10 件)
1. **丸山健太** “真菌感染随伴症状と ATP” 第 138 回 日本薬学会 一般シンポジウム “次世代のプリン作動性化学伝達遮断薬の創成を目指して”(金沢アートホール、金沢) 2018 年 日本語
 2. **丸山健太** “真菌感染随伴疼痛の生物学的意義とは？” 第 59 回 歯科基礎医学

- 会学術大会アップデートシンポジウム
(松本歯科大学、長野) 2017年 日本語
3. **丸山健太** “革新的組織滞留型抗炎症骨保護ペプチド” メディカルジャパン 2017 大阪(インテックス大阪、大阪) 2017年 日本語
 4. **丸山健太**, 高山靖規、富永真琴、審良静男、Mikaël M. Martino、余川隆 “骨神経免疫トライアングル理論を基盤とした真菌感染随伴疼痛の発生機構ならびにその生物学的意義に関する一考察” 痛み研究会 (自然科学研究機構 岡崎カンファレンスセンター、名古屋) 2017年 日本語
 5. **Kenta Maruyama** “New players in Osteo-innate-immune system and their unexpected roles; novel molecules for novel therapies” モナコ大学スペシャルセミナー (モナコ大学オーストラリア再生医学研究所 ARMI、オーストラリア) 2016年 英語
 6. **丸山健太** “Novel prophylactic targets of osteoporosis and pain : from Neuro-osteological point of view” 千里ライフサイエンス振興財団 第6回 産と学をつなぐ SENRI の会 (千里ライフサイエンスセンター、大阪) 2016年 日本語
 7. **丸山健太** “革新的局所滞留型抗炎症性骨保護ペプチド” 科学技術振興機構 大阪大学新技術説明会 (JST 東京本部別館 1F、東京) 2016年 日本語
 8. **丸山健太** “Identification of the osteoclast fusion inhibitor” アステラス病態代謝研究会竹中奨励賞 受賞講演 (東京工業倶楽部、東京) 2015年 日本語
 9. **丸山健太** “Novel therapeutic targets for bone destructive diseases” 第33回日本骨代謝学会学術集会日韓合同シンポジウム (京王プラザホテル、東京) 2015年 英語
 10. **Kenta Maruyama** “New players in skeletal

system and their unexpected roles: novel molecules for novel therapies” *The 4th CSI/JSI/KAI Joint Symposium* (Suzuhou Jinling Guanyuan International Hotel, 中国) 2015年 英語 すべて招待講演

〔図書〕(計 1 件)

1. **丸山健太** 「Type2 サイトカインによる感覚神経の直接刺激が痒みを増悪させる」実験医学、Vol35 No19、2017年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：真菌感染における宿主応答抑制剤

発明者：**丸山健太**、森山芳則、野村政壽

権利者：同上

番号：JP 特願 2017-134071

国内外の別：国内

名称：組織損傷治療剤

発明者：**丸山健太**、ミカエルマルティノーエム、審良静男

権利者：同上

番号：JP 特願 2016-036869

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

H29 生理学研究所研究会「第1回感覚免疫学研究会」代表提案者・世話人：**丸山健太**

6. 研究組織

(1) 研究代表者 丸山 健太

(Maruyama Kenta)

大阪大学世界最先端研究機構

免疫学フロンティア研究センター

研究者番号：60724119

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし